SNI

Standar Nasional Indonesia

SNI 2354.11:2009

Cara uji kimia-Bagian 11: Penentuan residu tetrasiklin dan derivatnya dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Daftar isi

Daftar isi i
Prakata ii
1 Ruang lingkup 1
2 Istilah dan definisi 1
3 Prinsip 1
4 Peralatan 2
5 Pereaksi 2
6 Penyiapan larutan baku pembanding tetrasiklin dan derivatnya 3
7 Kondisi KCKT 3
8 Prosedur 3
9 Pembacaan larutan baku kerja (sebagai kalibrasi internal rutin) 4
10 Pembacaan larutan *blanko*, *spike* dan contoh uji 4
11 Perhitungan 5
12 Pelaporan 5
13 Keamanan dan Keselamatan Kerja 5
Bibliografi 6

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Metode Uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini merupakan revisi SNI 01-4494-1998 dan disusun oleh Panitia Teknis 65-05 Produk Perikanan. Standar ini dirumuskan melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 4 Juni 2008 di Jakarta yang dihadiri oleh anggota Panitia Teknis 65-05 Produk Perikanan yang terdiri dari wakil-wakil produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan hasil perikanan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah:

1. Undang-Undang No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
2. Undang-Undang RI No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
3. Undang-Undang No. 31Tahun 2004 tentang Perikanan.
4. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
5. Peraturan Menteri No. PER.01/MEN/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
6. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. KEP. 06/MEN/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
7. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No KEP. 01/MEN/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Produksi, Pengolahan dan Distribusi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 21 Oktober 2008 sampai dengan 21 Januari 2009 dengan hasil akhir RASNI.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Cara uji kimia - Bagian 11: Penentuan residu tetrasiklin dan derivatnya dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan cara uji tetrasiklin dan derivatnya pada daging ikan.

2 Istilah dan definisi

2.1
antibiotik
senyawa kimia yang berasal dari jamur atau bakteri yang dapat membunuh mikroorganisme dan mengobati infeksi

2.2
metode analisa secara KCKT
suatu teknik analisa kualitatif dan kuantitatif yang didasarkan pada pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi deferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase yaitu fase diam dan fase cair yang bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat terpisah berdasarkan perbedaan mobilitas karena perbedaan absorbsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul dan muatan ion

2.3
spike
contoh yang ditambah dengan senyawa baku dalam jumlah tertentu sebagai kontrol positif

2.4
tetrasiklin
antibiotik yang diperoleh secara alami dari biakan bakteri *Streptomyces aureofraciens* untuk jenis klortetrasiklin-hidroklorida dan biakan bakteri *Streptomyces rimosus* untuk jenis oksitetrasiklin-hidroklorida atau diproduksi secara sintetik. Deklorinasi klortetrasiklin atau reduksi oksitetrasiklin menghasilkan tetrasiklin

2.5
waktu tambat atau *Retention Time* (RT)
waktu yang diperlukan analit/senyawa selama tertahan dalam kolom sampai keluar sebagai puncak kromatogram dihitung dari waktu injeksi

3 Prinsip

Contoh diekstraksi dengan larutan Na_2EDTA - *buffer McIlvaine*, fraksi *buffer* dipisahkan dengan sentrifuga. Supernatan dielusikan pada *Solid Phase Extraction* (SPE) C18 yang sebelumnya telah di deaktivasi dengan larutan *silylasi*. Hasil elusi dipekatkan menggunakan *rotary-vacum-evaporator* hingga tersisa volume 2 ml sampai 5 ml. Hasil pemekatan ditambah 5 ml etanol dan dipindahkan ke tabung reaksi selanjutnya dikeringkan dengan gas nitrogen. Residu dilarutkan kembali dengan 1 ml fase gerak (Asetonitril: Asam oksalat 0,02 M : Metanol = fraksi volume 15 % : 80 % : 5 %). Analit dalam fase gerak diinjeksikan pada kromatograf yang dilengkapi dengan kolom *phenyl* (150 mm x 4,6 mm) dengan prekolom CN 4 µm (20 mm x 3,9 mm) dan detektor fotometri pada 355 nm dengan menggunakan fase gerak (Asetonitril: Asam oksalat 0,02 M : Metanol = fraksi volume 15 % : 80 % : 5 %) . Respon KCKT berupa puncak-puncak kromatogram yang mempunyai waktu tambat (RT)

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

yang spesifik. Identifikasi puncak dilakukan dengan membandingkan RT contoh terhadap RT baku pembanding. Luas (area) kromatogam sebanding dengan jumlah analit tersebut.

4 Peralatan

a) *food grinder*;
b) kolom *phenyl* (150 x 4,6) mm dengan prekolom CN 4 um (20 x 3,9) mm;
c) *membran-filter*;
d) mikropipet;
e) *nitrogen evaporator*;
f) peralatan gelas;
g) *rotary-vacuum-evaporator*;
h) sentrifuga;
i) seperangkat alat KCKT yang dilengkapi dengan detektor fotometri;
j) tabung sentrifuga;
k) timbangan analitis;
l) *ultrasonic bath*;
m) *vortex*;
n) *vacuum manifold*.

5 Pereaksi

a) Na_2EDTA-*Buffer McIlvaine* (*Buffer* pengekstrak), dibuat sebagai berikut:

- timbang 28,41 g Na_2HPO_4 p.a, larutkan dengan aquades menjadi 1 liter.
- timbang 21,01 g asam sitrat p.a, larutkan dengan aquades menjadi 1 liter.
- campurkan 625 ml larutan Na_2HPO_4 (1) dengan 1 liter larutan asam sitrat (2), pastikan agar tercampur sempurna.
- timbang 60,49 g Na_2EDTA p.a, larutkan dengan campuran larutan (3), aduk agar larut sempurna.

CATATAN: larutan (4) dibuat sehari sebelum digunakan dan disimpan pada suhu dingin (refrigerator).

b) *Solid Phase Extraction* (SPE) C18 volume 6 ml, 500 mg;
c) *syringe* filter PTFE 0,45 µm;
d) metanol p.a;
e) metanol pro KCKT;
f) asetonitril pro KCKT;
g) air pro KCKT (*Water* LC *Grade* = WLC);
h) etanol p.a.;
i) diklorometana p.a.;
j) toluena p.a.;
k) asam Oksalat 0,02 M;
l) timbang 2,5214 g $C_2H_4O_2.2H_2O$ p.a., larutkan dengan air pro KCKT menjadi 1 liter
m) larutan *silylasi*;
n) campurkan 4 ml dimetildiklorosilane p.a. (DMCS) dengan 96 ml toluena.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

6 Penyiapan larutan baku pembanding tetrasiklin dan derivatnya

Larutan baku pembanding tetrasiklin meliputi Oksitetrasiklin HCl (OTC), Tetrasiklin HCl (TC), dan Klortetrasiklin HCl (CTC).

Larutan baku pembanding disiapkan dengan membuat larutan *stock* baku OTC, TC, CTC secara terpisah masing-masing 1000 µg/ml dengan cara sebagai berikut:

a) timbang seksama 50 mg baku tetrasiklin (OTC, TC, CTC) dalam gelas piala kecil, tambahkan 2 ml metanol, aduk hingga homogen kemudian pindahkan ke dalam labu takar 50 ml, tepatkan dengan air pro KCKT sehingga diperoleh konsentrasi larutan baku 1000 µg/ml (larutan *stock*).
b) buat larutan baku 20 µg/ml dengan mengencerkan larutan *stock.*
c) buat larutan baku kerja campuran (125 ng/ml; 250 ng/ml; 500 ng/ml; dan 750 ng/ml) dari baku 20 µg/ml dengan pelarut fase gerak.

7 Kondisi KCKT

a) detektor : fotometri 355 nm.
b) kolom : *phenyl* (150 mm x 4,6 mm).
c) pre-kolom : CN 4 µm (20 mm x 3,9 mm).
d) fase gerak : (asetonitril : asam oksalat 0,02 M : metanol = fraksi volume 15 % : 80 % : 5 %) gradien menjadi fraksi volume 27 % : 60 % : 13 %).
e) volume injek : 50 µl sampai 100 µl.
f) laju alir : 1,5 ml/menit.

8 Prosedur

8.1 Ekstraksi

a) siapkan tabung reaksi *polypropilen* bertutup kapasitas 50 ml.
b) siapkan contoh yang terdiri dari *blanko*, *spike* dan contoh uji sesuai tabel 1:

Tabel 1 - Persiapan *blanko*, *spike* dan contoh uji

Contoh	Berat contoh (g)	Volume larutan baku (10 µg/ml) yang ditambahkan (µl)		
		OTC	TC	CTC
Blanko pereaksi	-	-	-	-
Blanko contoh	5	-	-	-
Spike 100 ng/g	5	50	50	50
Spike 150 ng/g	5	75	75	75
Contoh uji ke1...dst	5	-	-	-

c) selanjutnya *blanko, spike* dan contoh uji yang sudah disiapkan ditambah pereaksi dan perlakukan sebagai berikut:
 1. tambahkan 2 ml diklorometana.
 2. kocok dengan *vortex* selama 1 menit.
 3. tambahkan 20 ml buffer pengekstrak, kocok dengan vorteks selama 1 menit.
 4. sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Pisahkan supernatan dari endapannya dan tampung.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

5. ulangi langkah 3 dan 4 sebanyak 2 kali terhadap endapan dan satukan supernatan dengan yang sebelumnya.
6. saring supernatan dengan kertas saring *whatman* No 1 tampung hasil penyaringan.

8.2 Pemurnian (*Clean up*)

Lakukan pemurnian (*clean-up*) untuk masing-masing *blanko*, *spike* dan contoh uji:

a) siapkan SPE C18 pada *vacuum manifold.*
b) elusikan 1 ml DMCS 4 % ke dalam SPE. Biarkan mengalir secara gravitasi dan tunggu 5 menit.
c) elusikan ke dalam SPE berturut-turut:
 - 5 ml metanol, biarkan terbuang.
 - 10 ml air pro KCKT, biarkan terbuang.
 - semua ekstrak contoh, biarkan terbuang.
 - 20 ml air pro KCKT, biarkan terbuang dan tunggu sampai kering.
 - elusikan analit yang tertahan dalam SPE dengan 30 ml metanol pro KCKT dan tampung dalam labu alas bulat.

8.3 Pemekatan

a) evaporasi analit dengan *rotary evaporator* pada suhu 30 °C hingga volume 2 ml sampai 5 ml.
b) tambahkan 5 ml etanol ke dalam labu alas bulat. Pastikan semua larut.
c) pindahkan ke dalam tabung reaksi.
d) keringkan dengan gas Nitrogen sehingga terbentuk residu analit.
e) larutkan residu analit dengan 1 ml fase gerak (asetonitril: asam oksalat 0,02 M: metanol = fraksi volume 15 % : 80 % : 5 %).
f) saring analit dengan *syringe* filter PTFE 0,45 µm.
g) analit siap diinjeksikan ke alat KCKT.

9 Pembacaan larutan baku kerja (sebagai kalibrasi internal rutin)

Baca larutan baku kerja yang sudah disiapkan pada alat KCKT hingga mendapatkan kurva baku dengan koefisien regresi 0,9. Apabila hasil pembacaan larutan baku kerja tersebut mendapatkan nilai koefisien regresi kurang dari 0,9 maka lakukan pengecekan terhadap kondisi alat dan larutan baku kerja. Jika nilai koefisien regresi telah mencapai lebih dari 0,9 maka kurva baku dengan persamaan $Y = a + bX$ dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi analit dalam contoh.

10 Pembacaan larutan *blanko*, *spike* dan contoh uji

Baca *blanko*, *spike* dan contoh yang didapat dari hasil pemekatan (8.3) dengan kondisi operasi alat yang sama pada saat kalibrasi rutin.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

11 Perhitungan

Masukkan nilai masing-masing area contoh dari hasil pembacaan ke persamaan garis kurva baku.
$Y = a + bX$

Keterangan:
Y adalah nilai area;
a adalah intersep;
b adalah *slope;*
X adalah konsentrasi contoh yang didapat (ng/ml).

Setelah didapat nilai X, kalikan dengan volume akhir dan dibagi dengan berat contoh.

$$\text{Konsentrasi tetrasiklin (ng/g)} = \frac{X\ (\text{ng/ml}) \times \text{Volume akhir (ml)}}{\text{Berat contoh (g)}}$$

Perhitungan juga dapat menggunakan satu titik konsentrasi dari larutan baku sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi tetrasiklin (ng/g)} = \frac{\left[\frac{(\text{Area contoh} - \text{Area blanko pereaksi})}{(\text{Area larutan baku} - \text{Area blanko baku})}\right] \times \text{Konsentrasi tetrasiklin (ng/ml)} - \text{Volume akhir (ml)}}{\text{Berat contoh (g)}}$$

12 Pelaporan

Jika angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi bila lebih dari 5 (lima) pembulatan keatas.

CONTOH:
14,454 dibulatkan menjadi 14,45
14,466 dibulatkan menjadi 14,47

Jika angka ke tiga di belakang koma 5 (lima), dan angka kedua genap, maka angka 5 (lima) tersebut menjadi hilang tetapi bila angka kedua ganjil maka pembulatan keatas.

CONTOH:
14,765 dibulatkan menjadi 14,76
14,475 dibulatkan menjadi 14,48

13 Keamanan dan Keselamatan Kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

a) cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisa.
b) gunakan jas laboratorium selama bekerja.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Bibliografi

Journal of Pharmaceutical and Biomedical. Vol 7 N0. 12, 1998. Determination of residues of tetracycline antibiotics in animal tissues by high-performance liquid chromatography, p.1829-1835.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id